

综述

脊髓损伤后星形胶质细胞的病理变化及相关治疗措施的进展

李建明, 初同伟

(第三军医大学新桥医院骨科 400037 重庆市)

中图分类号: R683.2, R329.2

文献标识码: A

文章编号: 1004-406X(2007)-08-0632-03

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)往往预后较差, 致残率高。其病理过程尚不十分清楚, 治疗也一直是困扰医学界的难题。脊髓损伤后星形胶质细胞(astrocyte, AS)的病理变化及其相关的治疗措施一直是研究的重点。笔者就近年来这一领域的研究进展综述如下。

1 脊髓损伤后 AS 的病理变化

1.1 AS 的激活与增殖

胶质细胞是神经系统内数目众多的一大类细胞群体, 约占中枢神经系统细胞的 90%, AS 是其主要组成成分。正常情况下 AS 分为静止态、活化态和增殖态, 这三者的相互转化构成广义上的细胞周期。在正常的中枢神经系统中, 静止态和活化态的胶质细胞并存; 当受到损伤时, 在细胞因子的作用下静止态的细胞逐渐向活化态转化^[1]。活化型 AS(active astrocyte, AA)所含的某些脱氢酶的同工酶活性明显增高, 神经胶质原纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 表达上调, 并且在形态上表现为细胞体积增大。有研究表明^[2], AS 具有活跃的细胞周期, 在缺血、损伤等刺激下, 大量 AS 快速进入活化分裂期, 进行有丝分裂, 最终使其数目增加、胞体肥大且交织成网状, 增殖细胞核抗原(PCNA)表达增强, 5-溴脱氧尿苷(5-BrdU)阳性细胞比率增加。AS 的增殖活化与很多因素有关^[3]: ①接触抑制(contact inhibition)功能减退。细胞间的相互接触使 P21 蛋白(一种细胞周期素依赖性激酶抑制剂)水平升高, 并抑制 pRb 蛋白(由抑癌基因 Rb 表达, 可抑制细胞在 G1/S 期的转变)的磷酸化。解除接触抑制后, 细胞周期调节抑制因素作用减弱, 损伤周围的 AS 重新进入细胞周期。②损伤部位的 AS 通过自分泌、旁分泌细胞因子促进自身的分裂增殖^[3], 包括睫状神经营养因子(CNTF)、碱性成纤维生长因子(bFGF)、胶质细胞成熟因子(GMF)、转化生长因子 B(TGF2B)、肿瘤坏死因子 2A(TNF2A)、干扰素 2C(INF2C)、白介素 21B(IL21B)、表皮生长因子(EGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、胰岛素生长因子(IGF)等。CNTF、IL21B 刺激 AS 由静息态转化为活化态; TGF2A、

EGF 及 FGF22 刺激活化 AS 进入细胞周期; TGF2B、TNF2A 及 INF2C 促进反应性胶质化和胶质疤痕的形成^[4]。③高分子量的葡萄糖胺聚糖透明质酸(HA)可以维持 AS 的一种“休眠”状态, 是 AS 增殖的抑制因素。AS 体外培养实验表明^[5], 添加 HA 会抑制试管内 AS 的增殖。脊髓损伤后, HA 降解, 对 AS 增殖的抑制减弱, 其增殖活动明显增强。④粘蛋白 C 对 AS 的刺激作用是双向的, 在体外培养的 AS 中加入粘蛋白 C 后, AS 很少表现为活跃型。表明粘蛋白 C 能明显减少体外培养的 AS 的增殖率。但是长时间混合粘蛋白 C 培养又可以部分刺激其成为活化型^[6]。因此, 可以针对粘蛋白 C 来治疗 SCI。

1.2 AS 在脊髓损伤过程的作用

AS 在神经系统发育期主要是诱导神经细胞的迁移, 发育成熟以后的 AS 主要功能是维持神经组织形态, 同时其在提供神经营养因子、参与细胞间的通讯等方面也发挥重要作用^[7]。目前认为 AS 在脊髓损伤过程中具有双重作用: (1)早期可以产生 20 多种细胞因子, 如 bFGF、CNTF、GMF、TGF2B、EGF 等, 它还能分泌前列腺素和其他几种白细胞介素(interleukin, IL), 如 IL-1、IL-3、IL-6 等。这些细胞因子对维持神经元的生长、发育、再生和分化均有重要作用。另外, 活化增殖胶质细胞及其产生的细胞因子可将损伤区与外界隔离, 避免其受到感染。有利于损伤修复。(2)在正常情况下, 胶质细胞与脑、脊髓的脉管系统通过钙信号通道保持着某种“平衡态”; 缺氧、损伤等因素造成胶质细胞激活后过度增生, 可形成微血管套, 压迫微血管, 影响血液供应^[8]。AS 达到成熟期结构型时, 在诱导期所具有的多种有益功能逐渐消失, 反而分泌有害因子, 形成化学性胶质屏障, 影响神经再生, 阻碍轴突的延长^[9]。反应性 AS 还能产生大量一氧化氮, 通过对大分子特别是 DNA 的修饰产生毒性作用, 可导致神经元发生迟发性坏死^[10]。胶质细胞过度增生, 形成“胶质疤痕”, 导致机械性障碍, 影响轴突的再生、延长、融合^[11]。这些都不利于损伤脊髓修复, 因此研究脊髓损伤后 AS 的病理变化及如何控制胶质细胞的过度增殖、阻止胶质疤痕形成已成为目前研究者关注的重点。

2 针对 AS 的治疗措施

2.1 抑制活化型 AS 的增殖

第一作者简介: 男(1978-), 主治医师, 硕士在读, 研究方向: 脊柱外科

电话: (023)68755608 E-mail: ljmsien@163.com

通讯作者: 初同伟

olomoucine 是一种化学合成的细胞周期蛋白依赖性激酶(cdk)抑制蛋白,其作用机制为竞争 ATP 结合位点而抑制蛋白激酶活性,可选择性地抑制 cdk1、cdk2、cdk5 和 erk1,而对 cdk6 的抑制作用弱,对 cdk4 则无抑制作用^[12]。olomoucine 能够使细胞出现 G1 期停滞和 G2/M 期转化阻滞,促进中/后期的转换,提高 DNA 损伤因子诱导的细胞凋亡水平。Olomoucine 对细胞凋亡的影响是复杂的,与细胞类型、抑制的 cdk 类型等有关。国外研究表明^[13],成年小鼠中枢神经系统损伤后,具备有丝分裂能力的细胞如 AS、小胶质细胞等明显活化,细胞数目增加、胞体肥大且交织成网状,大量进入增殖期。通过中枢给药法予以 olomoucine 干预后,可明显减少细胞周期蛋白的增量调节,抑制 AS、小胶质细胞的增殖,减轻胞体肥大。可见损伤刺激能够促使胶质细胞细胞周期启动、反应性增殖活化;而特异性细胞周期抑制剂 olomoucine 可以通过调控周期素依赖的蛋白激酶抑制反应性胶质细胞的肥大、增殖。现在面临的问题是 olomoucine 在抑制 AS 的同时会不会也抑制神经元的再生和轴突的延长?有待进一步的研究探索。

2.2 阻止 AS 的激活

钙蛋白酶是一种水溶性的钙依赖性半胱氨酸蛋白酶。病理状态下,钙离子浓度异常增高可激活钙蛋白酶,使其对多种细胞骨架和蛋白质产生降解作用。脊髓损伤时,钙蛋白酶的病理性激活是神经元死亡的关键媒介,也是 SCI 继发性损伤的“触发器”。钙蛋白酶抑制剂 MDL28170 能阻止钙蛋白酶 I 激活、AS 活化和神经元细胞死亡。国外学者发现^[14],在小鼠脊髓横断模型的髓鞘内注入 MDL28170 可以改善脊髓损伤的病理过程,抑制钙蛋白酶的激活。1 周后反转录 PCR 提示 MDL28170 明显降低了细胞凋亡基因 Bcl-2 mRNA 的表达,减少了神经元的凋亡。同时 AS 的活化被抑制,胶质瘢痕明显减少。可见,髓鞘中注入 MDL28170 是治疗 SCI 的有效途径之一。

2.3 调控 AS 核转录因子 NF-kappaB

核转录因子 NF-kappaB 是脊髓损伤后炎症反应和继发性损伤的关键因素。脊髓损伤或者病变后,NF-kappaB 从属基因表达活性明显升高。研究表明^[15],在小鼠脊髓半横断模型中,选择性灭活 AS 核转录因子 NF-kappaB 的启动子后,许多致炎因子,如 cxcl10、ccl2 等均减少;GFAP 及硫酸软骨素纤维蛋白分泌也明显减少,抑制了胶质瘢痕的形成,8 周后小鼠下肢活动功能明显改善。可见,抑制 AS 中 NF-kappaB 的表达对脊髓损伤产生了保护作用。因此,抑制 NF-kappaB 途径可作为一种治疗 SCI 的靶向途径。

2.4 限制性胶质细胞前体细胞移植

限制性胶质细胞前体细胞(glial-restricted precursor, GRP)是少突胶质细胞和 AS 的前体细胞^[16],可由转基因大鼠胚胎中分离出来,人胎盘碱性磷酸酶可以检测移植 GRP 的存活情况。GRP 移植入损伤部位后不久,分化成少突胶质细胞和 AS,并且继续保持分化能力。移植后的 GRP 能够改善受伤部位的微环境,减少胶质瘢痕的产生和抑制性

蛋白聚糖的表达。移植 GRP 后并没有观察到轴突长距离再生,但它确实改变了轴突生长锥的形态,而且在 GRP 细胞移植中找到了轴突的神经纤维^[16]。所以,移植 GRP 细胞可以作为治疗 SCI 的方法加以研究^[17]。

2.5 基因修饰 AS

基因修饰 AS 主要有基因封闭、基因敲除和体外修饰后再移植等。基因封闭即反义核酸技术是利用人工合成或重组的与靶基因互补的一段反义 DNA 或 RNA 片段,特异性地与靶基因结合,达到封闭其表达的目的。具体原理是利用基因工程技术,在适宜的启动子和增强子之间反向插入靶基因,使其表达反义 RNA,通过与靶 mRNA 的结合,阻止 mRNA 的翻译;或者人工合成一段反义 RNA,抑制靶 mRNA 的表达,均可达到特异性抑制靶基因表达的目的。有人^[18]针对 GFAP 基因结构的特点,将含编码 GFAP 基因第 1 外显子起始密码区的一段长约 1.1kb 的 cDNA 质粒反向插入逆转录病毒载体中,通过病毒 DNA 整合到 AS 基因组中,利用长末端重复序列(LTR)启动反义 GFAP 基因的转录,合成反义 RNA,特异性地封闭 GFAP mRNA 的表达。结果表明重组逆转录病毒感染了正常 AS 基因组,使其胞体变圆,突起变细、回缩;细胞生长曲线提示 AS 呈生长抑制状态;细胞周期分析发现 G1 期阻滞。可见重组反义 GFAP 逆转录病毒有效地抑制了 GFAP 基因表达,减轻了 AS 对损伤的反应。因此,利用重组反义 GFAP 逆转录病毒来抑制 AS 对损伤的反应,将有可能在体内抑制或延缓胶质瘢痕形成,从而为神经再生和功能重建创造良好的微环境。基因敲除是用基因转移的方法将一段 DNA 片段转移至受体细胞内,转移基因可以取代受体细胞染色体基因组上一段长度相同的 DNA 片段,取代方式有随机整合和同源重组。基因敲除可以用突变或修饰过的基因敲除相应的正常基因,也可以用正常基因敲除相应的突变基因。国外学者^[19]运用该技术将小鼠 GFAP 和中间丝弹性蛋白基因敲除掉,有效地阻止了二者的分泌,减少了胶质瘢痕的形成,促进了 SCI 后轴突的再生延长。体外修饰后再移植是体外培养 AS,以病毒为载体,通过改良基因后,再将 AS 移植入脊髓损伤处。有人^[20]体外培养成年大鼠皮质 AS,以 HIV-I 衍生型病毒为 GFAP 基因载体,荧光染料烟儿可碱为标记,将转染和标记的细胞悬液注入脊髓损伤部位,观察到植入的 AS 存活并整合到宿主中,保持分泌 GFAP 的能力 6 周以上。证明用病毒感染 AS 可以作为一种分泌因子的工具来治疗 SCI。

近年来的研究表明,治疗脊髓损伤单独应用某一种治疗方法均不能达到理想的临床康复,多种方法结合运用效果更佳。比如周期素依赖的蛋白激酶抑制剂 olomoucine 能抑制活化型 AS 的增殖,这时 AS 所产生的神经营养因子也必然减少,如果将 olomoucine 与相关神经营养因子如 NT-3、IGF、GDNF 等合用,也许能收到较好的效果。因此综合性治疗脊髓损伤将是今后研究的突破点。

3 参考文献

1. 朱舟,王伟,谢敏杰,等.CDK 抑制剂 olomoucine 对星形胶质细胞增殖活化的影响[J].华中科技大学学报,2005,34(2):159.
2. Bernaudin M,Tang Y,Reilly M,et al. Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat i-identification of genes that might contribute to hypoxia-induced ischemic tolerance [J].J Biol Chem,2002,277 (42): 39728-39738.
3. Morita M,Kozuka N,Itofusa R, et al. Autocrine activation of EGF receptor promotes osciation of glutamate-induced calcium increase in astrocytes cultured in rat cerebral cortex[J].J Neurochem,2005,95(3):871-879.
4. Albrecht PJ,Dahi JP,Stoltfus OK,et al.Ciliary neurophic factor activates spinal cord astrocytes,stimulating their production and release of fibroblast growth factor-2,to increase motor neuron survival[J].J Exp Neurology,2002,173(1):46-62.
5. Struve J,Maher PC,Li YQ,et al.Disruption of the hyaluronan-based extracellular matrix in spinal cord promotes astrocyte proliferation[J].Glia,2005,52(1):16-24.
6. Holley JE,Gveric D,Whatmore JL,et al.Tenascin C induces a quiescent phenotype in cultured adult human astrocytes[J].Glia, 2005,52(1):58-58.
7. Gimenez Y,Ribotta M,Menet V,et al.The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS[J].Prog Brain Res, 2001,132:587-610.
8. West H,Richardson WD,Fruttiger M. Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes [J].Development,2005,132 (8):1855-1862.
9. Hobohm C,Gunther A,Grosche J, et al. Decomposition and long-lasting downregulation of extracellular matrix in perineuronal nets induced by focal cerebral ischemia in rats [J].J Neurosci Res,2005,80(4):539-548.
10. Kozuka N, Itofusa R,Kudo Y,et al. Lipopolysaccharide and proinflammatory cytokines require different astrocyte states to induce nitric oxide production [J].J Neurosci Res,2005,82 (5):717-728.
11. Alonso G. NG2 proteoglycan-expressing cells of the adult rat brain:possible involvement in the formation of glial scar astrocytes following stab wound[J].Glia,2005,49(3):318-338.
12. Krystof V,McNae IW,Walkinshaw MD,et al. Antiproliferative activity of olomoucine II ,a noval 2,6,9 -trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor[J].Cell Mol Life Sc, 2005,62(15):1763-1771.
13. Cernak J,Stoica B,Byrnes KR,et al. Role of the cellcycle in the pathobiology of central nervous system trauma[J].Cell Cycle,2005,4(9):1286-1293.
14. Hung KS,Hwang SL,Liang CL, et al. Calpain inhibitor inhibits p35-p25-Cdk5 activation,decreases tau hyperphosphorylation,and improves neurological function after spinal cord hemisection in rats [J].J Neuropathol Exp Neurol,2005,64 (1):15-26.
15. Brambilla R,Bracchi RV,Hu WH, et al. Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury [J].J Exp Med,2005,202(1):145-156.
16. Hill CE,Proschel C,Noble M, et al. Acute transplantation of glial-restricted precursor cells into spinal cord contusion injuries:survival,differentiation,and effects on lesion environment and axonal regeneration [J].Exp Neurol,2004,190(2): 289-310.
17. Miller RH. Building bridges with astrocytes for spinal cord repair[J].J Biol,2006,5(3):6.
18. 黄其林,蔡文琴,张可成.反义 GFAP 逆转录病毒表达载体的构建及其对反应性星形胶质细胞的作用[J].解剖学报,2000, 31(2):102-107.
19. Menet V,Prieto M,Privat A,et al.Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes[J].Proc Natl Acad Sci USA,2003,100(15):8999-9004.
20. Pencialet P,Serguera C,Corti O,et al. Integration of genetically modified adult astrocytes into the lesioned rat spinal cord[J].J Neurosci Res,2006,83(1):61-67.

(收稿日期:2006-11-24 修回日期:2007-05-08)

(本文编辑 卢庆霞)

消息

欢迎订购《中国脊柱脊髓杂志》2007 年合订本(上册)

《中国脊柱脊髓杂志》2007 年合订本(上册)为精装本,定价 100 元/册。本刊经理部可随时为国内外读者代办邮购(免邮寄费)。有需要者请与本刊经理部联系。地址:北京市朝阳区中日友好医院内《中国脊柱脊髓杂志》经理部,邮编:100029。联系电话:(010)64206649,64284923。

汇款时请在汇款单上注明“订购《中国脊柱脊髓杂志》2007 年合订本(上册)”及册数。